

氏 名	船 崎 俊 介
学 位 の 種 類	博士 (医学)
学 位 記 番 号	甲第 640 号
学位授与年月日	令和 3 年 3 月 15 日
学位授与の要件	自治医科大学学位規定第 4 条第 2 項該当
学 位 論 文 名	糖尿病発症に関する新規メカニズムとしての Trpm2 経路異常
論 文 審 査 委 員	(委員長) 石 橋 俊 教 授 (委 員) 田 島 敏 広 教 授 中 條 浩 一 教 授

論文内容の要旨

1 研究目的

食後の血糖上昇に追従して生じるインスリン分泌には、刺激直後の急峻な第 1 相とその後の持続的な第 2 相が存在する。第 1 相インスリン分泌は糖尿病前段階～2 型糖尿病患者で低下していることや、ヒトは糖尿病を発症する約 10 年前から既に食後高血糖を生じていることが知られている。膵 β 細胞でのグルコースやインクレチンによるインスリン分泌機構には TRPM2 (transient receptor potential melastatin 2) チャネルを介した非選択性陽イオンチャネル電流 (背景電流) の増加が重要であると我々のグループは報告したが、TRPM2 をノックアウトしたモデルマウス (TRPM2-KO マウス) は第 1 相のインスリン分泌が抑制されていることが報告され、これは糖尿病初期の病態と類似している。すなわち、糖尿病発症そのものに TRPM2 チャネルの異常が関連していることが示唆されるが、それらに関する詳細な報告はなかった。さらに TRPM2 より下流のシグナル解析についても詳しいことは分かっていない。新規経口血糖降下薬イメグリミンは TRPM2 と関連しインスリン分泌を刺激する分子である cADPR(cyclic ADP- ribose)を介した作用を持つ可能性が示唆されている。本研究は、糖尿病自然発症モデル動物において TRPM2 チャネルの機能異常が糖尿病発症に関与しているか否か、さらにそのうえで、TRPM2 が cADPR を介したインスリン分泌に寄与しているかについてイメグリミンを用いて検討することを目的とした。

2 研究方法

糖尿病自然発症モデル動物として Goto-Kakizaki ラット (GK)を用いた。5 週齢 GK ラット(GK5)を糖尿病発症早期、8 週齢 GK ラット (GK8)を糖尿病発症後として比較検討を行った。2g/体重の経口ブドウ糖負荷試験 (OGTT: Oral glucose tolerance test)、ラットの単離膵島を用いたバッチインキュベーション法によるインスリン分泌・cAMP 測定を行った。また、単離された膵 β 細胞の培養細胞を用いて、穿孔パッチによるホールセルモードパッチクランプ法により、背景電流 (保持電位: -70 mV、100 μ M トルブタミド存在下)を測定した。また、イメグリミンに対する検討には野生型 (WT : wild-type) マウスおよび TRPM2-KO マウスを用いた。バッチインキュベーション法によるインスリン分泌・NAD⁺ 測定を行った。マウスに対してもラットと同様に膵 β 細胞の培養細胞を用いて、穿孔パッチによるホールセルモードパッチクランプ法により、背景電流を測定した。

3 研究成果

OGTT の結果、GK8 は GK5 と比較して有意にグルコース刺激後早期の血糖値が高値であった。糖負荷前のインスリンは GK5 と比較して GK8 で有意に高く、空腹時の時点で既にインスリン抵抗性が生じている可能性が示唆された。GK8 では空腹時インスリンが高値であったため絶対値の比較でなく、糖負荷前後のインスリンの差を Δ インスリン値と定義し評価を行ったところ、GK8 で負荷後早期の Δ インスリンは有意に低下していた。また、パッチインキュベーション法を用いた検討では、GK5 では 10 分、60 分の 16.6 mmol/L glucose (mMG) による刺激で 2.8 mMG と比較し有意にインスリン分泌が増加していたが、GK8 では 60 分の 16.6 mMG による刺激でのみインスリン分泌の有意な増加を認めた。パッチクランプ法を用いた検討では GK8 がグルコースによるトルブタミド添加条件における背景電流が抑制されており、Exendin-4 による反応が保持された。GK8 膵島の cAMP 産生は 2.8mMG と比較して低下していた。野生型ラットや GK5 膵島において cADPR インヒビターは G 濃度依存性インスリン分泌を抑制したが、GK8 では認めなかった。WT マウス膵島の実験でイメグリミンは第 1 相インスリン分泌増強を認め、 NAD^+ を増加させた。イメグリミンによる第 1 相インスリン分泌増強効果は cADPR インヒビター (8-Bromo-cADPR) および TRP チャネルブロッカー (2-Aminoethoxydiphenylborane) により抑制された。TRPM2-KO マウス膵島ではイメグリミンによる第 1 相インスリン分泌の増強を認めなかった。パッチクランプ法を用いた検討では TRPM2-KO マウスでイメグリミンによる TRPM2 チャネルの開口が検出されなかった。

4 考察

OGTT、膵島のインスリン分泌測定の結果から GK8 では第 1 相インスリン分泌が減弱していることがわかった。また、電気生理学的実験から GK8 の第 1 相インスリン分泌減弱の原因は、グルコースに対する TRPM2 チャネルの反応が減弱しているためと示唆された。GK8 では 16.6 mMG の刺激において cAMP 産生の増加反応が見られなかったが、2.8 mMG の時点で十分に cAMP を産生しており、16.6 mMG において cAMP 産生量そのものが低下していなかった。cAMP 産生量低下がインスリン分泌減弱の原因ではない可能性が考えられた。他のシグナル低下について検討を行うこととし、先行研究を参考に cADPR に着目した。細胞内 Ca^{2+} のセカンドメッセンジャーとして知られる cADPR は、TRPM2 チャネルの強力なオープナーであり、膵 β 細胞インスリン分泌への関与が報告されている。そこで cADPR の阻害薬も用いた検討を行なった。cADPR の前駆体は NAD^+ であるが、イメグリミンは NAD^+ を増加させ、cADPR を介したインスリン分泌作用が示唆されている。本研究においてもイメグリミンが NAD^+ を増加させることを確認でき、またパッチインキュベーションや電気生理学的実験の結果から、イメグリミンは cADPR-TRPM2 チャネルを介したインスリン分泌を持つことが分かった。

TRPM2 蛋白は足場蛋白としての機能を有する。TRPM2 の低下は膵 β 細胞のインスリン分泌に不可欠な SUR1 (sulfonylurea receptor type 1)、EPAC (Exchange protein directly activated by cAMP) といった分子を正しい位置にとどめる作用の減弱が影響している可能性も考えられる。しかしながら、本研究では TRPM2 チャネルを介した背景電流の低下が確認されている。チャネルとしての TRPM2 機能低下が GK ラットの第 1 相インスリン分泌低下およびイメグリミンのインスリン分泌

シグナルに重要であると考えられた。

cADPR を産生する分子に白血球細胞表面抗原のひとつとして知られる CD38 が挙げられるが、CD38 をノックアウトしたモデル動物では β 細胞が障害され、CD38 の遺伝子変異でインスリン分泌が減少することが知られている。ヒトの TRPM2 には cADPR が直接結合できるポケットがあり、cADPR が TRPM2 を直接活性化させることも近年報告されている。今回インスリン分泌という視点で cADPR - TRPM2 の連関を示し、また経口血糖降下薬であるイメグリミンの、インスリン分泌における新規メカニズムとしても新たな知見を得ることができた。

5 結論

GK ラット由来の膵島は、その週齢とともにグルコース刺激によるインスリン第 1 相分泌が低下し、同時にグルコースによる TRPM2 チャネルの開口が抑制される。すなわち、糖尿病発症の過程で TRPM2 チャネル開口抑制が重要である可能性が示唆された。さらにそのシグナルに cADPR が関与し、新規経口血糖降下薬であるイメグリミンは cADPR-TRPM2 経路を介したインスリン分泌を示すことが示唆された。TRPM2 経路の障害が 2 型糖尿病を発症する前に生じるインスリン分泌第 1 相低下を引き起こしその後の血糖上昇をもたらす要因の一つであれば、cADPR-TRPM2 経路を介したインスリン分泌改善を可能とするイメグリミンは糖尿病発症そのものを予防することができる薬剤として活用できることも考えられる。

論文審査の結果の要旨

膵 β 細胞のインスリン分泌機構における非選択的陽イオンチャネル(NSCC)としての TRPM2 の意義が注目されている。そこで、申請者は 2 型糖尿病自然発症モデルである GK ラット由来の膵島を用いた実験を実施した。5 週齢では保たれていたグルコース刺激性インスリン分泌(GSIS)第一相が 8 週齢で低下し、トルブタミド添加条件における 5 週齢で観察された高グルコース添加時の背景電流の増加が 8 週齢で消失した。一方、Exendin-4 添加で観察される背景電流増加は 8 週齢でも保たれていた。Wister ラットや 5 週齢 GK ラットで観察される膵島内の cAMP 増加反応は 8 週齢で消失した。この増加反応は cADPR 阻害活性を有する 8-Bromo-cADPR 添加で顕著に抑制された。cAMP は EPAC2A を介して TRPM2 を刺激し、この経路とは独立に ATP から CD38 の作用によって産生される cADPR も TRPM2 を刺激すると報告されていることから、GK ラット膵島のグルコース刺激性の背景電流増加反応の加齢に伴う低下現象には、グルコース代謝に伴う cAMP と cADPR の産生増加反応の低下が関与し、その下流にある TRPM2 の活性低下の関与が示唆された。

次に、申請者はマウス膵島を用いて、新規糖尿病治療薬イメグリミンのインスリン分泌促進作用機序を検討した。イメグリミンは GSIS を増強した。膵島内 NAD⁺濃度は高グルコースで増加し、この増加は 8-Bromo-cADPR 添加で消失した。TRPM2 チャネルブロッカーである 2-APB 添加でもイメグリミンによる GSIS の増強反応は消失した。また、TRPM2KO 由来の膵島ではイメグリミンによる GSIS の増強反応が観察されなかった。イメグリミン添加により増強されるトルブタミド添加条件における野生型膵島の高グルコース添加時の背景電流増加反応は、TRPM2KO 由来の膵島では観察されなかった。以上から、イメグリミンによる GSIS 増強効果には、cADPR

産生増加を介した TRPM2 の活性化の関与が推測された。

背景電流低下が、加齢に伴う GK ラットの GSIS 第一相低下へ寄与し、その正体が TRPM2 である可能性がある。さらに、イメグリミンの GSIS 増強作用における TRPM2 活性化の関与を申請者は提唱している。

GK ラットの糖尿病発症における膵 β 細胞の TRPM2 活性化不全とイメグルミンの GSIS 増強効果における TRPM2 の関与を明らかにした本研究は、新規性・独創性が高い。

委員から以下の指摘があった：1) 統計の妥当性、2) 遺伝型データが未提示、3) 「トルブタミド添加条件の背景電流」を「TRPM2 チャンネルの反応」と同義とすることへの疑義、4) パッチクランプの実験結果の提示法、5) その他の表現上の問題。

以上の指摘に対し適正に改訂がなされたため、博士論文として合格であると評価した。

最終試験の結果の要旨

- ・申請者の発表は研究の背景・目的・方法・結果・考察について必要十分な説明があった。
- ・GSIS における TRPM2 の意義、GK ラットひいてはヒト 2 型糖尿病に認められる GSIS 低下における TRPM2 電流低下の意義、イメグリミンの GSIS 増強作用における TRPM2 の関与等の命題は継続して探求させるべき重要な課題であり、今回の論文で不足したデータ採取等についても明確に示された。
- ・審査員からの質疑についてその内容を正しく理解し、適切に応答できた。
- ・研究に関連する周辺領域の知識は十分である。
- ・以上から、申請者の研究能力及び科学的素養・態度は学位に値するものと全員一致で評価した。